(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2007-236331
(P2007-236331A)
(43)公開日　平成19年9月20日(2007.9.20)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
C12Q	1/06	(2006.01)	C12Q	1/06		4B065
C12N	1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A	4C167
A61M	37/00	(2006.01)	A61M	37/00		
C12R	1/42	(2006.01)	C12N	1/20	A	

審査請求 未請求　請求項の数 11　ＯＬ　（全 14 頁）　最終頁に続く

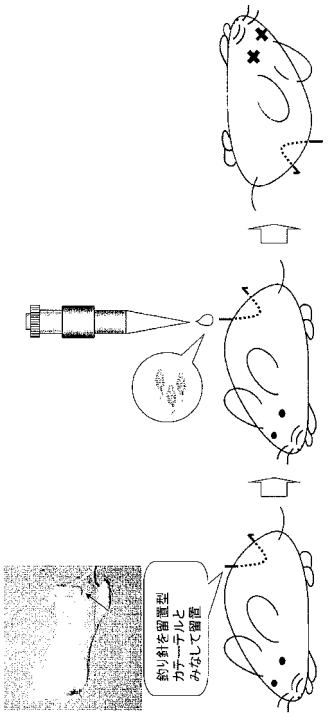
(21)出願番号　特願2006-65636(P2006-65636)
(22)出願日　平成18年3月10日(2006.3.10)

(71)出願人　301023238
独立行政法人物質・材料研究機構
茨城県つくば市千現一丁目２番地１
(71)出願人　803000056
財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
東京都中央区日本橋小伝馬町１３－４
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷　優子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】医療機器の生物学的評価方法

(57)【要約】
【課題】カテーテル、ドレーン等の医療機器を介した感染の危険性を、前臨床段階で簡便かつ定量的に評価するための方法を提供すること。
【解決手段】評価対象である医療機器と同一の材料で構成される湾曲したワイヤー及び／又はチューブを用意し、これを非ヒト哺乳動物の体内にその両端が外部に露出するように穿刺し、前記穿刺部位に強毒性のサルモネラ属微生物を１回あるいは２回以上接種し、最初の接種から５週間以内における動物の生死又は感染に基づいて、前記医療機器を介した感染の危険度を評価する。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくともその一部が外部に露出した状態で体内に挿入あるいは留置される医療機器の生物学的評価方法であって：
１）前記医療機器と同一の材料で構成される湾曲したもしくは直線状のワイヤー及び／又はチューブを用意し、
２）前記ワイヤー及び／又はチューブを、非ヒト哺乳動物の体内に両端もしくは片末端が外部に露出するように穿刺し、
３）前記穿刺部位に強毒性の病原性微生物を１回あるいは２回以上接種し、
４）最初の接種から５週間以内における前記動物の生死又は感染の評価に基づいて、前記医療機器を介した感染の危険度を評価することを特徴とする方法。
【請求項２】
前記動物の生死が、死に至る動物の数とそれまでの日数により評価され、前記動物の感染が、穿刺したワイヤー及び／又はチューブに付着した微生物や、動物の細胞、血液、組織又は臓器中の微生物や微生物由来成分の、細菌培養法や分子生物学的手法を用いた検出・同定によって評価されることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
非ヒト哺乳動物が齧歯類である請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
非ヒト哺乳動物がマウスである請求項３に記載の方法。
【請求項５】
マウスが病原性微生物に対して高感受性のマウスである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
マウスがｎＲＡＭＰ及びＴＬＲ－４を欠失した系統である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
強毒性の病原性微生物が強毒性のサルモネラ属微生物である、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
サルモネラ属微生物が受付番号ＦＥＲＭ－ＡＰ－２０８３２で特定される菌株、又はこれと同等の毒性を有するその変異株である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
医用機器が、カテーテル、ドレーン、カニューレ、経皮端子、医療用センサー、医療用ワイヤー、創外固定器用ピン、電極、チューブ、ソケットから選ばれるいずれかである、請求項１～８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
受付番号ＦＥＲＭ－ＡＰ－２０８３２で特定されるサルモネラ属微生物、又はこれと同等の毒性を有するその変異株。
【請求項１１】
受付番号ＦＥＲＭ－ＡＰ－２０８３２で特定されるサルモネラ属微生物、又はこれと同等の毒性を有するその変異株と、細菌を保存したアンプル管、培養液、菌液希釈液、取り扱い説明書、及びピペットから選ばれる少なくとも１つ以上を構成要素として含む、医療機器の感染評価用キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、医用機器を介した感染の危険性を評価する方法に関する。より詳しくは、少なくともその一部が外部に露出した状態で体内に挿入あるいは留置されるカテーテル、ドレーン等の医用機器を介した感染の危険性を、前臨床段階で簡便かつ定量的に評価するための方法に関する。
【背景技術】

【０００２】
カテーテルやドレーンを使用した医療処置において、最も問題となる合併症は感染である。特に、血管や尿路に留置されるカテーテルは感染のリスクが高く、血管内カテーテルを留置した１０人に一人はカテーテル関連の菌血症を来たし、カテーテル菌血症に起因する死亡率は３～３５％に至るとの報告もある。カテーテル感染は、身体的苦痛はもとより、入院期間の延長や医療費の増大をもたらすことで、患者に大きなダメージを与える。
【０００３】
これに対し、抗菌コーティング等の抗菌素材を用いた感染防止カテーテルなど、これまでさまざまな感染防止機器が開発されてきた。しかしながら、その効力はいずれも不十分で、一般化されるに至っていない。これは前臨床段階において、感染の有無を定量的に判断する基準がなく、機器開発の指針が確立されていないからとされている。
【０００４】
国際規格であるISO 10993は、医療機器の生物学的評価方法として、その第６部で「埋込後の局所的影響の試験」について規定する。しかし、ここに規定される試験方法は、医療機器の体内における生体適合性や安全性の評価はできるが、その一部が体外に露出した状態で使用されるカテーテル等による感染の危険性を適切に評価することはできない。
【０００５】
一方、カテーテル感染の一般的な評価法として、１，０００カテーテル日（延べ使用日数１，０００日当たりで生じる感染件数：感染症の発症件数／延べ使用日数×1,000）がある。この方法は、同種の医療機器全般に適用可能で、院内感染サーベイランス診断の一つとして実施されることも多い。しかしながら、これは臨床段階あるいは実使用段階での感染率の評価基準であって、医療機器を前臨床段階で評価するための基準ではない。
【０００６】
前臨床段階での評価法として、Okadaらは、ウサギ背部に経皮的にデバイスを埋植し、肉眼及び組織切片観察で感染（潰瘍、膿瘍）の有無を確認するとともに、カテーテルと皮膚との接着の強さを引っ張り強度測定により測定している（非特許文献１）。また、Aokiらは、犬背部に経皮的にデバイスを埋植し、肉眼観察、組織切片観察、皮膚のダウングロース（陥没）深さの測定を行っている（非特許文献２）。しかし、これらの方法はいずれも定量化に欠けるという問題がある。
【０００７】
Knowlesらは、新生児包皮を用いたin vitro試験として、種々のバイオマテリアル繊維を包皮に貫通させて培養し、そのダウングロース（陥没）を組織切片により観察しているが、マテリアルと皮膚組織の相互作用を観察しているのみで、カテーテル感染を直接的に定量化していない（非特許文献３）。Walboomersらは、ラット背部に経皮的にデバイスを埋植し、肉眼観察により、皮膚の色、滲出液の有無、肉芽組織の有無、皮膚のダウングロース(陥没)の有無をスコア化している。この方法は、半定量的ではあるが、観察者の恣意的な解釈が入るため信憑性に欠ける（非特許文献４）。
【０００８】
カテーテル片をアガー培地に静置し細菌の繁殖状態を観察する方法：Modified Kirby-Bauer techniqueもあるが（非特許文献５）、これは材料そのものの抗菌性試験であり、カテーテル感染の有無を直接的に定量化するものではない。また、ウサギにカテーテルを経皮的に埋植して細菌を接種し、７日後に取り出したカテーテルの材料片を培養し、生じる細菌コロニーをカウントすることで感染を定量化する方法：Sherertz rabbit modelもあるが（非特許文献５及び６参照）、カテーテルへの細菌固着がカテーテル感染発生率と相関があるとは限らない。さらに、in vitro培養モデルにより、カテーテルに固着した細菌の数を定量して、長期の抗菌性評価を行う方法もあるが（非特許文献７）、この値もカテーテル感染とは直接相関しない。
【０００９】
カテーテル（各種抗菌剤で被覆したものもある）をウサギに留置し、埋植したカテーテル側面に細菌を注入接種し、その後カテーテルを抜去し、膿瘍形成や皮下組織の評価、抜

去したカテーテルによる抗菌性評価を行った報告もある（非特許文献８～１０）。しかしながら、皮下への細菌の注入接種という点でこれらの方法は現実的ではない。

【００１０】

【非特許文献１】Okada T, Ikada Y., J Biomater Sci Polym Ed. 1995;7(2):171-80.
【非特許文献２】Aoki H, Akao M, Shin Y, Tsuzi T, Togawa T., Med Prog Technol. 1987;12(3-4):213-20.
【非特許文献３】Knowles NG, Miyashita Y, Usui ML, Marshall AJ, Pirrone A, Hauch KD, Ratner BD, Underwood RA, Fleckman P, Olerud JE., J Biomed Mater Res A. 2005;74(3):482-8.
【非特許文献４】Walboomers XF, Jansen JA., J Biomed Mater Res A. 2005 ;74(3):381-7.
【非特許文献５】Raad I, Darouiche R, Hachem R, Mansouri M, Bodey GP, J Infect Dis. 1996 Feb;173(2):418-24.
【非特許文献６】Sherertz RJ, Carruth WA, Hampton AA, Byron MP, Solomon DD., J Infect Dis. 1993 ;167(1):98-106.
【非特許文献７】Tcholakian RK, Raad II., Antimicrob Agents Chemother. 2001 ;45(7):1990-3.
【非特許文献８】Bassetti S, Hu J, D'Agostino RB Jr, Sherertz RJ., Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(5):1535-8.
【非特許文献９】Bassetti S, Hu J, D'Agostino RB Jr, Sherertz RJ., Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 Aug;19(8):612-7.
【非特許文献１０】Raad I, Darouiche R, Hachem R, Mansouri M, Bodey GP, J Infect Dis. 1996 ;173(2):418-24.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

上記の現状に鑑み、本発明は、カテーテル等の医療機器を介した感染の危険性を前臨床段階において簡便かつ定量的に評価する方法を確立し、院内感染防止に高い効果を示す新規な医療機器の開発を促進することを目的とする。具体的には、実使用段階での評価法である「１，０００カテーテル日」等と相関する、前臨床段階における新たなin vivo評価法を確立することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明者らは、経口接種や無傷皮膚への塗布では致死的ではないが、剃毛の傷に感染してマウスを死に至らしめる、強毒性のサルモネラ菌株の樹立に成功した。そして、この菌株を用いることにより、カテーテル等の医療機器による感染の危険性を評価する方法を確立した。

【００１３】

すなわち、本発明は、少なくともその一部が外部に露出した状態で体内に挿入あるいは留置される医療機器の生物学的評価方法であって：

１）前記医療機器と同一の材料で構成される湾曲したもしくは直線状のワイヤー及び／又はチューブを用意し、

２）前記ワイヤー及び／又はチューブを、非ヒト哺乳動物の皮下にその両端もしくは片末端が外部に露出するように穿刺し、

３）前記穿刺部位に強毒性の病原性微生物を１回あるいは２回以上接種し、

４）最初の接種から５週間以内における前記非ヒト哺乳動物の生死又は感染に基づいて、前記医用機器を介した感染の危険度を評価することを特徴とする方法に関する。

【００１４】

前記動物の生死は、たとえば、死に至る動物の数とそれまでの日数により評価することができる。また前記動物の感染は、たとえば、穿刺したワイヤー及び／又はチューブに付

着した微生物や、動物の細胞、血液、組織又は臓器中の微生物や微生物由来成分を、細菌培養法や分子生物学的手法を用いて検出・同定することにより評価することができる。

【００１５】

本発明で使用される非ヒト哺乳動物としては、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、サル、イヌ、ネコなどの大中動物でもよく、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の齧歯類が好ましく、マウスがより好ましい。

【００１６】

前記マウスは、病原性微生物に対して高感受性の系統であることが好ましい。そのようなマウスとしては、市販のBALB/cやC57BL系統のようなNrampI$^{Asp\ 169}$(NrampIの169番目のアミノ酸がアスパラギン酸)でTLR4を発現しているものを標準として使用することができる。NrampI欠損・TLR4発現マウスも同様な目的で使用できる。感受性の感度をさらにあげる目的で、C57BL/10ScCr系統のようなNrampI$^{Asp\ 169}$発現・TLR4欠損マウス又はC3H/ HeJとBALB/cを交配させた 系統のようなNrampI$^{Asp\ 169}$発現・TLR4^{His712}マウス、NrampI及びTLR4ダブル欠損マウスを使用してもよい。あるいは、感受性の感度を低下させる目的で、市販のDBA2、BALB/c.DBA2やC3H系統のようなNrampI$^{Gly\ 169}$(NrampIの169番目のアミノ酸がグリシン)でTLR4を発現しているものを使用してもよい。

【００１７】

本発明で使用される強毒性の病原性微生物としてはサルモネラ属微生物が好ましく、その好適な一例として、受付番号ＦＥＲＭ－ＡＰ－２０８３２で特定される菌株や、これと同等の毒性を有するその変異株を挙げることができる。

【００１８】

また、本発明の方法で評価される医療機器としては、たとえば、カテーテル、ドレーン、カニューレ、経皮端子、医療用センサー、医療用ワイヤー、創外固定器用ピン、電極、チューブ、ソケットを挙げることができる。

【００１９】

本発明はまた、受付番号ＦＥＲＭ－ＡＰ－２０８３２で特定されるサルモネラ属微生物、又はこれと同等の毒性を有するその変異株や、これを構成要素として含む医用機器の感染評価用キットを提供する。本発明のキットは、その構成要素として、前記サルモネラ属微生物のほかに細菌を保存したアンプル管、培養液、菌液希釈液、取り扱い説明書、ピペット等を含んでいてもよい。

【発明の効果】

【００２０】

本発明によれば、カテーテル等の医療機器を介した感染の危険性を、前臨床段階において簡便かつ定量的に評価することができる。本方法が、感染評価の標準化した方法として確立されれば、その基準に則って新規な感染防止機器の開発が促進される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２１】

以下、適宜図面を参照しながら、本発明について詳細に説明する。

１．医療機器

本発明において評価対象となる医療機器は、少なくともその一部が外部に露出した状態で体内に挿入、埋設、あるいは留置される医用機器であって、その材質や形状は特に限定されない。具体的には、カテーテル、ドレーン、カニューレ、経皮端子、医療用センサー、医療用ワイヤー、医療用チューブ、創外固定器用ピン、電極、チューブ、ソケット等を挙げることができる。これらの医療機器は、その一部が外部に露出した状態で使用されるため、挿入・埋設時や医療機器自体の汚染による感染のほか、穿刺部位を介した挿入・埋設後の感染が問題となる。本発明は、特にこうした穿刺部位からの感染を含めた、医療機器使用時における感染の危険性を、その開発段階早期において定量的に評価する。

【００２２】

２．医療機器模擬サンプル

本発明では、前記医療機器の模擬サンプルとして、当該医療機器と同一の材料で構成さ

れるワイヤー及び／又はチューブ状の構造体を用いる。ここで、「ワイヤー」とは、湾曲可能な針金状あるいは棒状の細長い構造を意味し、その太さや長さは、対象となる医用機器や動物により適宜設定される。ワイヤーの断面は、円形である必要はなく、動物の体内に挿入可能な形状であればよい。ワイヤーの一端は、好ましくは挿入が容易なように、針状のとがった形状であるとよく、動物がワイヤー及び／又はチューブ状の構造体を引き抜く場合は先端に「返し」を必要とする。また、「チューブ」とは、湾曲可能な中空の管状構造を意味し、その太さや長さは対象となる医療機器や動物により適宜設定される。たとえばマウスを被験動物とする場合、前記ワイヤーの太さは、好ましくは0.1～30ｍｍ、より好ましくは0.1～10ｍｍ程度（断面を円とみなした場合の最大径：その他の形状の場合はこれに準じて決定される）、長さは、好ましくは1～100ｍｍ、より好ましくは10～30ｍｍ程度である。また、チューブの太さは、好ましくは0.2～50ｍｍ、より好ましくは0.2～20ｍｍ程度、長さは、好ましくは1～100ｍｍ、より好ましくは、10～30ｍｍ程度である。

【００２３】

前記ワイヤー及び／又はチューブは湾曲又は棒状の構造でもよい、また、チューブを装着したガイドワイヤーのような態様で、チューブはワイヤーに装着して試験に用いてもよい。ワイヤー及び／又はチューブ状の構造体の外部に露出する部位、もしくは皮下及び体内の部位、もしくは全体に抗菌剤をコート、もしくは感染を防止する部具、機器等を取り付けることにより、細菌感染防止の効能を評価することが出来る。

【００２４】

図２に、本発明で用いられるワイヤー及びチューブの一例を示す。図２に示すように、ワイヤーとチューブは、それぞれ単独（図２の左及び中）あるいは組み合わせて（図２の右）、試験に使用される。ワイヤー及び／又はチューブ状の構造体の外部に露出する部位、もしくは皮下及び体内の部位、もしくは全体に抗菌剤をコート、もしくは感染を防止する部具、機器等を取り付つけることにより、塗布した薬剤、装着した部具、機器等の細菌感染防止の効能評価試験に使用される。

【００２５】

３．動物

本発明で用いられる非ヒト哺乳動物は、接種される微生物に対して高感受性の動物であればよく、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、サル、イヌ、ネコなどの大中動物でも良いが、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の小型齧歯類が好ましい。特に、使用が簡便で各種系統が確立されているマウスがより好ましく、なかでも微生物感染に対して高感受性の系統、たとえば市販のBALB/cやC57BL等のNrampI$^{Asp\ 169}$でTLR4を発現しているものを標準として使用するとよい。NrampI欠損・TLR4発現マウスも同様な目的で使用できる。さらに本発明では、感受性の感度をさらにあげる目的で、C57BL/ 10ScCr 系統のようなNrampI$^{Asp\ 169}$発現・TLR4欠損マウス、又はC3H/ HeJとBALB/cを交配させた系統のようなNrampI$^{Asp\ 169}$発現・TLR4^{His712}マウス、NrampI及びTLR4ダブル欠損マウスを使用してもよい。あるいは、感受性の感度を低下させる目的で、市販のDBA2、BALB/c.DBA2やC3H系統のようなNrampI$^{Gly\ 169}$(NrampIの169番目のアミノ酸がグリシン)でTLR4を発現しているものを使用してもよい。ｎＲＡＭＰ及びＴＬＲ－４はそれぞれNrampI及びTLR4をコードする遺伝子であり、公共のデータベースであるGenBankにそれぞれAccession No. L13732とNo. AF110133として登録されている。これら遺伝子を欠失させたトランスジェニックマウスは、常法にしたがって容易に作製することができ、感染に対して高感受性なマウスとして本発明の方法に好適に用いられる。

【００２６】

４．病原性微生物

本発明で用いられる病原性微生物は、院内感染等で問題になる微生物であって、創傷部位からの感染により致死的となる強い毒性を持った微生物が好ましい。そのような微生物としては、たとえば、病原性細菌の例としては、ブドウ球菌（例えば、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）又は腐性ブドウ球菌（Staphylococcus saprophyticus））、連鎖球菌属（例えば、化膿性連鎖球菌、

肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）又はアガラクチア菌（Streptococcus agalactiae））、腸球菌（例えば、糞便連鎖球菌、又はエンテロコッカス・ファシウム（Enterococcus faecium））、コリネバクテリア（corynebacteria）属（例えば、ジフテリア菌（Corynebacterium diptheriae））、バシラス属（例えば、炭疽菌（Bacillus anthracis））、リステリア属（例えば、リステリア菌（Listeria monocytogenes））、クロストリジウム（Clostridium）属（例えば、ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）、破傷風菌、（Clostridium tetanus）、ボツリヌス菌（Clostridium notulinum）、クロストジウム・ディフィシル（Clostridium difficile））、ナイセリア（Neisseria）属（例えば、髄膜炎菌（Neisseria meningtidis）又は淋菌（Neisseria gonorrhoeae））、大腸菌、赤痢菌、サルモネラ（Salmonella）属、エルシニア（Yersinia）属（例えば、ペスト菌（Yersinia pestis）、偽結核菌（Yersinia pseudotuberculosis）、又はエルシニア・エンテロコロチカ（Yersinia enterocolitica））、コレラ菌（Vibrio cholerae）、カンピロバクター（Campylobacter）属（例えば、カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）又はカンピロバクター・フィータス（Campylobacter fetus））、ピロリ菌（Helicobacter pylori）、シュードモナス属（例えば、緑膿菌又はシュードモナス・マレイ（Pseudomonas mallei））、インフルエンザ菌（Haemophilus influenza）、百日咳菌（Bordetella pertusis）、肺炎マイコプラズマ（Mycoplasma pneumoniae）、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（Ureaplasma urealyticum）、レジオネラ・ニューモフィラ（Legionella pneumophila）、梅毒トレポネーマ（Treponema pallidum）、レプトスピラ・インタロガンス（Leptospira interrogans）、ライム病菌（Borrelia burgdorferi）、マイコバクテリウム属（例えば、結核菌（Mycobacterium tuberculosis））、ライ菌（Mycobacterium leprae）、放線菌（Actinomyces）、ノカルディア（Nocardia）属、クラミジア属（例えば、オウム病クラミジア（Chlamydia psittaci）、トラコーマ病原体（Chlamydia trachomatis）又は肺炎クラミジア（Chlamydia pneumoniae））、リケッチア（例えば、リケッチア・リケッチー（Rickettsia ricketsii）、発疹チフスリケッチア（Rickettsia prowazekii）又はリケッチア・アカリ（Rickettsia akari））、ブルセラ属（例えば、ウシ流産菌（Brucella abortus）、ヤギ流産菌（Brucella melitensis）又はブタ流産菌（Brucella suis））、プロテウス・ミラビリス（Proteus mirabilis）、霊菌、エンテロバクター・クロカエ、アセチノバクター・アニトラタス、肺炎桿菌及びフランシセラ・ツラレンシス（Francisella tularensis）が挙げられるがこれらに限定されない。特に、ブドウ球菌、連鎖球菌、腸球菌、サルモネラ属、クロストリジウム属、大腸菌、エルシニア属、シュードモナス属、プロテウス・ミラビリス、霊菌、が重要である。

【００２７】

特に、発明者が樹立した強毒性のサルモネラ属微生物Salmonella Enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)株は、経口接種や無傷皮膚への塗布では致死的ではないが、剃毛の傷に感染してマウスを容易に死に至らしめる強毒性の菌株であり、本発明の方法に好適に用いられる。この菌株は多系統の抗菌薬に対して感受性を有するため、試験を行う者が万が一感染しても、既存の抗菌薬にて容易に治癒可能である。なお、この菌株は受付番号ＦＥＲＭ-ＡＰ－２０８３２として、２００６年３月７日付で独立行政法人　産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１-１-１　つくばセンター 中央第６）に寄託されている。なお、この菌株と少なくとも同等の毒性を有する限り、その変異株もまた、本発明の方法に好適に用いることができる。

【００２８】

５．試験方法

図１に本発明の試験方法の概要を示した。

（１）医療機器模擬サンプルの挿入

本発明では、前記した医療機器模擬サンプルとしてのワイヤー及び／又はチューブを非ヒト哺乳動物の体内にその両端もしくは片末端が外部に露出するように穿刺（挿入）する。医療機器模擬サンプルは抗菌剤をコートしたものでもよく、感染防止機能を有する部具、機器をワイヤー及び／又はチューブの外部に露出する部位、もしくは皮下及び体内の部

位、もしくは全体に被覆したものでも良い。両端が外部に露出し片末端の先に返しがあるように穿刺するのは、穿刺したワイヤー及び／又はチューブが動物によって簡単に除去されないようにするためである。

穿刺する部位は、特に限定されないが、背部、腹部、臀部、頭部、頸部等が好ましい。

【００２９】

（２）病原性微生物の接種

前記医療機器模擬サンプルの穿刺部位に、病原性微生物を接種する。微生物の接種量は、使用する動物と微生物の毒性に応じて適宜設定され、釣り針等を用いた試験で最初の接種から３～４週間以内に死に至るような量が好ましい。たとえば、マウスを被験動物とした場合の、SE11F1株（ＦＥＲＭ-ＡＰ－２０８３２）の接種量は１回あたり30～300 CFU/mouse程度である。臨床現場における汚染は断続的になされると想定されるため、微生物の接種は、少なくも週１回～５回程度の頻度で行うことが好ましい。

【００３０】

（３）感染危険度の評価

感染の危険度は、前記微生物接種を受けた動物の生死又は感染により評価する。

動物の生死については、具体的には死に至る動物の数とそれまでの日数により、感染の危険度を定量的に評価する。１つの評価で使用する動物の数は、統計的信頼性の点から少なくとも１群６以上であり、無傷皮膚への適用群等の対照を設けて実施する。

【００３１】

動物の感染については、具体的には体内に挿入したワイヤー及び／又はチューブ、もしくは前記微生物接種を受けた動物の血液、細胞、組織、臓器中に存在する微生物を、細菌培養法を用いて検出・同定することにより、定量的に評価する。あるいは、前記動物の血液、細胞、組織、臓器中に存在する前記微生物由来のDNA、RNAやタンパク質を、公知の分子生物学的手法を用いて検出・同定することにより、定量的に評価する。なお、DNA、RNAの検出・定量は、RT-PCR、リアルタイムPCR、ノーザンブロッティング法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション、及びDNAチップやアレイなどの固相化試料を用いたハイブリダイゼーションアッセイ等により実施でき、またタンパク質の検出・定量は、ウェスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、及びRIA法等により実施することができる。

【００３２】

６．キット

本発明の方法は、カテーテル等の医療機器を介した感染の危険性を前臨床段階において簡便かつ定量的に評価することができ、したがって感染評価の標準化した方法として確立することが可能である。そこで、本発明はこうした感染評価方法のためのキットを提供する。

【００３３】

本発明のキットは、受付番号ＦＥＲＭ－ＡＰ－２０８３２で特定される強毒性のサルモネラ属微生物 No. 11 FUNA (SE11F1)株、又はこれと同等の毒性を有するその変異株を構成要素として含む。そのほか、このキットには、本発明の評価方法の実施に必要な器具や試薬、たとえば、細菌を保存したアンプル管、培養液、菌液希釈液、取り扱い説明書、ピペット等が構成要素として含まれる。

【実施例】

【００３４】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【００３５】

[実施例１] サルモネラ強毒株 No. 11 FUNA (SE11F1)株の樹立

１．材料

(1) マウス: BALB/c

(2) 供試菌株：Salmonella Enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)

【００３６】
２．方法
Salmonella Enteritidis臨床分離株を1 x 10^3CFU/mouseを６匹のBALB/c 雌に腹腔内接種し、最も早く死亡したマウスの肝臓から、同菌を分離、増菌後、同様の操作を20回繰り返し、最終的に分離した菌を分注して、凍結保存及び凍結乾燥保存した。
【００３７】
３．結果
Salmonella Enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)は、通性嫌気性グラム陰性桿菌で、強毒株である。（データを示す）ペニシリンなど抗生剤に対しては極めて感受性が高い。
【００３８】
以上のようにして樹立したサルモネラ強毒株 No. 11 FUNA (SE11F1)は、受付番号ＦＥＲＭ-ＡＰ－２０８３２として、２００６年３月７日付で独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１-１-１　つくばセンター 中央第６）に寄託されている。
【００３９】
[実施例２]　創傷感染した微生物のマウスに対する致死活性
１．材料
(1) マウス: BALB/cA Jcl　6週齢♀　1群：6匹
(2) 供試菌株：Salmonella Enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)、Staphylococcus aureus ATCC25923 (S. aureus)、Enterohemorrhagic Escherichia coli SM^R (EHEC SM^R)
【００４０】
２．方法
マウスの背部を剃毛し、翌日、釣り針（10号：株式会社ささめ針、XM-01）をマウスの背部皮下に穿刺し、残置した。穿刺部位に各菌株それぞれ3.0 x10^6CFU/5μl/mouse を塗布した（接種菌数は予め計測された検量線と波長630nm の吸光度に基づいて調整した）。コントロールとして、針を穿刺していないマウスに各菌株を同量塗布した。臨床現場における汚染は断続的になされると想定されるため、その後週５回（月火水木金）の頻度で同様に各菌株を塗布しながら、マウスの生死を観察した。
【００４１】
３．結果
結果を表１に示す。表１に示されるように、No. 11 FUNA (SE11F1)株は経皮感染により、9日で全マウスを死亡させた。一方、他の菌株は同じ菌量同じ頻度での塗布を４週間継続させてもマウスを死亡させることはなかった。
【００４２】
【表１】

経日 / 死亡数	7日	8日	9日	14日	21日	28日
SE11F1（穿刺部塗布）	3	2	1(全て死亡)			
S. aureus（穿刺部塗布）	0	0	0	0	0	0
EHEC SM^R（穿刺部塗布）	0	0	0	0	0	0
SE11F1（剃毛部塗布）	0	0	0	0	0	0
S. aureus（剃毛部塗布）	0	0	0	0	0	0
EHEC SM^R（剃毛部塗布）	0	0	0	0	0	0

【００４３】

[実施例３] 創傷感染させたサルモネラ強毒株 No. 11 FUNA (SE11F1)株のマウスに対する致死活性

１．材料

(1) マウス: BALB/cA Jcl 6週齢♀ 1群：6匹

(2) 供試菌株：Salmonella Enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)

【００４４】

２．方法

(1) 穿刺部位接種

マウスの腎部から背部にかけて剃毛した。翌日、釣り針（10号：株式会社ささめ針、XM-01）をマウスの背部皮下に穿刺し、残置した。穿刺部位にSE11F1株それぞれ3.0×10^4、3.0×10^3、3.0×10^2、3.0×10^1 CFU/5μl/mouseを塗布した（接種菌数は予め計測された検量線と波長630nm の吸光度に基づいて調整した）。

【００４５】

(2) 経口接種

腸内細菌叢非撹乱（抗菌性物質を経口投与しない）マウスに、胃ゾンデを用いてSE11F1株を経口接種した。これは、体表に接種した菌株が飼育環境を汚染した場合の経口感染を想定したものである。

【００４６】

臨床現場における汚染は断続的になされると想定されるため、いずれの群も週１回接種、すなわち針残置後：0日、7日、14日、21日に同様に塗布あるいは経口接種しながら、マウスの生死を観察した。

【００４７】

３．結果

結果を表２に示す。表２に示されるように、SE11FI株は3.0×10^1 CFU/mouse の週１回接種により、４週で全てのマウスを死亡させた。一方、3.0×10^5 CFU/mouseの週１回の経口接種ではマウスは１匹も死亡しなかった。

【００４８】

【表２】

経　日 / 死亡数	7日	10日	13日	14日	15日	23日	24日	25日	27日	28日
SE11F1 （穿刺部塗布） 3.0×10^{4} CFU/5μl/mouse	2		4							
SE11F1 （穿刺部塗布） 3.0×10^{3} CFU/5μl/mouse	2			1	3					
SE11F1 （穿刺部塗布） 3.0×10^{2} CFU/5μl/mouse		2	1	1				1	1	
SE11F1 （穿刺部塗布） 3.0×10^{1} CFU/5μl/mouse			2	2		1	1			
SE11F1 （剃毛部塗布） 3.0×10^{4} CFU/5μl/mouse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
経口(腸内細菌叢非撹乱) 3.0×10^{6} CFU/ml/mouse	6									
経口(腸内細菌叢非撹乱) 3.0×10^{5} CFU/ml/mouse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
経口(腸内細菌叢非撹乱) 3.0×10^{4} CFU/ml/mouse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
経口(腸内細菌叢非撹乱) 3.0×10^{3} CFU/ml/mouse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【００４９】

［実施例４］　Salmonella enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)株の薬剤感受性

１．材料

（１）供与株菌：Salmonella enteritidis No. 11 FUNA (SE11F1)株

（２）抗菌薬剤：アンピシリン、ピペラシリン、アンピシリン＋スルバクタム、セファゾリン、セフメタゾール、セフォタキシム、セフォタキシム、セフタジジム、セフピロム、イミペネム、アズトレオナム、アミカシン、ミノサイクリン、シプロフロキサシン、ホスホマイシン、クロラムフェニコール、スルファメトキサゾール＋トリメトプリム

【００５０】

２．方法

バイテック自動細菌同定検査システム（日本ビオメリュー株式会社製）のグラム陰性菌感受性カードGNS-441を用いて薬剤感受性を測定した。

【００５１】

３．結果

結果を表３に示す。表３に示されるように、多系統の抗菌薬による低い最小発育阻止濃度を示すことから、全ての薬剤に対してNo.11 FUNA株は感受性を有することが認められた。すなわちNo.11 FUNA株を取り扱う場合、万が一感染しても抗菌薬にて治癒可能であることを意味している。

【００５２】

【表３】

Salmonella enteritidis No.11 FUNA(SE11F1)株の薬剤感受性（MIC:最小発育阻止濃度）

系統	抗菌薬名	MIC	耐性
ペニシリン系	アンピシリン	≦0.25μg/ml	≧32μg/ml
	ピペラシリン	≦8μg/ml	≧128μg/ml
ペニシリン系＋β-ラクタマーゼ阻害系	アンピシリン＋スルバクタム	≦4μg/ml	≧32μg/ml
セフェム系	セファゾリン（第一世代）	≦8μg/ml	≧32μg/ml
	セフメタゾール（第二世代）	≦16μg/ml	≧64μg/ml
	セフォタキシム（第三世代）	≦4μg/ml	≧64μg/ml
	セフタジジム（第三世代）	≦8μg/ml	≧32μg/ml
	セフピロム（第四世代）	≦4μg/ml	≧32μg/ml
カルバペネム系	イミペネム	≦4μg/ml	≧32μg/ml
モノバクタム系	アズトレオナム	≦2μg/ml	≧64μg/ml
アミノグリコシド系	アミカシン	≦2μg/ml	≧64μg/ml
テトラサイクリン系	ミノサイクリン	≦2μg/ml	≧16μg/ml
新キノロン系	シプロフロキサシン	≦0.5μg/ml	≧4μg/ml
ホスホマイシン系	ホスホマイシン	≦16μg/ml	≧64μg/ml
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	≦8μg/ml	≧32μg/ml
合成抗菌薬	スルファメトキサゾール＋トリメトプリム	≦10μg/ml	≧80μg/ml

【産業上の利用可能性】

【００５３】

本発明の方法により、カテーテル等の医用機器を介した感染の危険性を、前臨床段階において簡便かつ定量的に評価することができる。本発明の方法が、感染評価の標準化した方法として確立されることにより、新規な感染防止機器の開発が促進される。したがって、本発明の方法は、医用機器の開発、院内感染防止をはじめとする医療の分野で有用である。

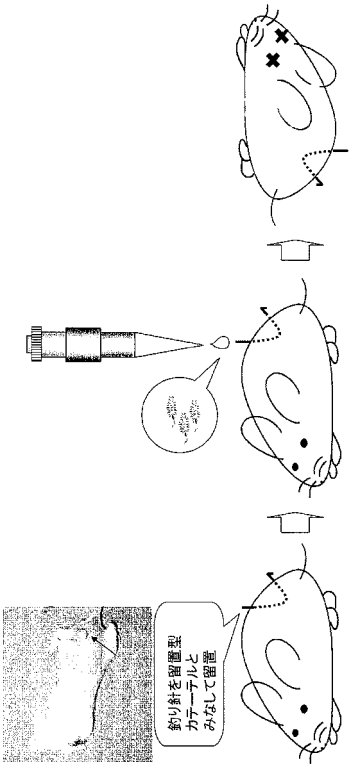
【図面の簡単な説明】

【００５４】

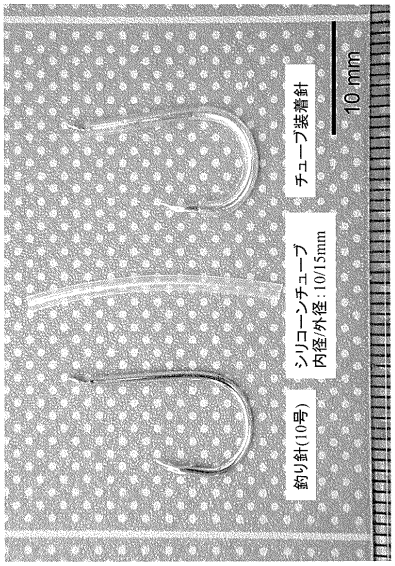
【図１】図１は、本発明の評価方法の概要を示した図である。

【図２】図２は、本発明の評価方法に使用されるカテーテルモデルの写真である。図中、左：実施例２及び３で使用した釣り針、中：シリコーンチューブ（内径/外径：10/15mm）、右：チューブ装着針である。

【図１】


釣り針を留置型
カテーテルと
みなして留置

【図２】


釣り針(10号)
シリコーンチューブ
内径/外径：1.0/1.5mm
チューブ装着針
10 mm

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	FI	テーマコード（参考）
	Ｃ１２Ｒ　1:42	

(72)発明者　田中　順三
茨城県つくば市千現一丁目２番１号　独立行政法人物質・材料研究機構内
(72)発明者　田口　哲志
茨城県つくば市千現一丁目２番１号　独立行政法人物質・材料研究機構内
(72)発明者　船渡川　圭次
栃木県足利市寺岡町４８９－４
(72)発明者　斎藤　明
神奈川県川崎市麻生区王禅寺西４丁目２－３０
(72)発明者　切替　照雄
東京都新宿区戸山１－２１－１　国立国際医療センター内
(72)発明者　濱端　崇
東京都新宿区戸山１－２１－１　国立国際医療センター内
(72)発明者　古薗　勉
大阪府吹田市藤白台５－７－１　国立循環器病センター内

Ｆターム(参考)　4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ06 QQ08 QQ17 QR72 QR75 QR77 QS31
QX01 QX10
4B065 AA46X AC20 BA22 CA46
4C167 AA01 AA28 AA39 AA74 BB23 CC01 DD10 GG16 HH08 HH10